

Synthese einer Partialsequenz aus dem aktiven Zentrum der Streptokokken-Proteinase, II^[1]

Eugen Schaich und Friedhelm Schneider

(Der Schriftleitung zugegangen am 5. März 1974)

Zusammenfassung: Die Synthese der geschützten Hexapeptide Z-Glu(OBu^t)-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-N₂H₃ und H-Glu(OBzl)-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-OH aus der Sequenz des aktiven Zentrums der Strepto-

kokken-Proteinase wird beschrieben. Dieses Hexapeptid wird mit einem geschützten Tetrapeptid zum Dekapeptid Z-Val-Lys(Z)-Pro-Gly-Glu(OBzl)-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-OH verknüpft.

Synthesis of a fragment of the active center sequence of the streptococcal proteinase, II

Summary: The synthesis of the protected hexapeptides Z-Glu(OBu^t)-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-N₂H₃ and H-Glu(OBzl)-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-OH is described. This peptide is a fragment of the active

center sequence of the streptococcal proteinase. The hexapeptide is coupled with a tetrapeptide, forming the decapeptide Z-Val-Lys(Z)-Pro-Gly-Glu(OBzl)-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-OH.

In der vorangehenden Arbeit^[1] haben wir die Synthese eines geschützten Tetrapeptids (Fragment I) aus einer Sequenz des aktiven Zentrums der Streptokokken-Proteinase beschrieben. In der vorliegenden Mitteilung berichten wir über die Synthese des sich anschließenden Hexapeptids sowie die Verknüpfung der Fragmente I und II zum Dekapeptid Val-Lys-Pro-Gly-Glu-Gln-Ser-Phe-Val-Gly, das das Teilstück 1–10 der Partialsequenz umfaßt.

Synthese des Fragments II: Glu-Gln-Ser-Phe-Val-Gly

Die Synthese dieses Fragments wurde auf zwei Wegen durchgeführt, ausgehend von Glycin-methylester (Synthese-Schema I) und Glycin-*p*-nitrobenzylester^[2] (Synthese-Schema II); durch Kupplung mit Z-Val-ONp^[3] und Z-Phe-ONp^[4] konnten die Tripeptidester beider Synthesewege

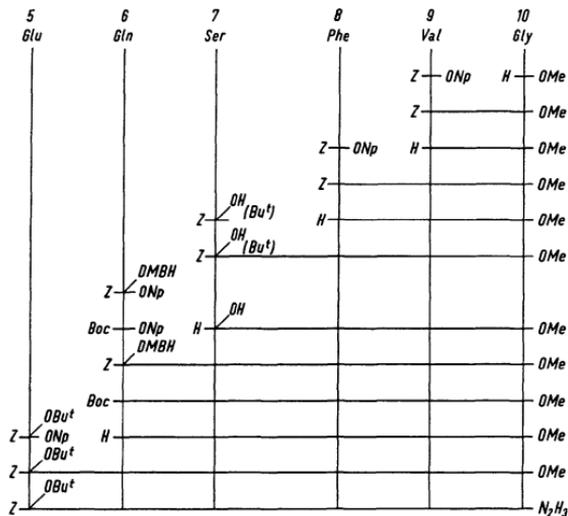
glatt erhalten werden, wenn auch die Kristallisation des Z-Phe-Val-Gly-OBz(NO₂) einige Mühe bereitete. Das sich anschließende Serin 7 konnte sowohl als Z-Derivat mit freier OH-Gruppe als auch als *t*-Butyläther^[5] mit Dicyclohexylcarbodiimid/Hydroxybenzotriazol ohne Schwierigkeiten mit den Tripeptidestern umgesetzt werden.

Die Verlängerung des an der Serinhydroxylgruppe ungeschützten Tetrapeptid-methylesters mit Boc-Gln-ONp^[6] lieferte ein nur noch in heißem Dimethylformamid lösliches Produkt. Zum selben Ergebnis führte die Umsetzung des am Serin geschützten Peptidesters mit Boc-Gln-ONp und Z-Gln(DMBH)-ONp^[7]. Die Einführung weiterer Schutzgruppen hatte also die Löslichkeitseigenschaften keinesfalls verbessert. Das nach Abspaltung des Boc-Restes erhaltene Gln-Ser-Phe-Val-Gly-OMe ließ sich mit Z-Glu(OBu^t)-ONp zum geschützten, schwerlöslichen Hexapeptidester kup-

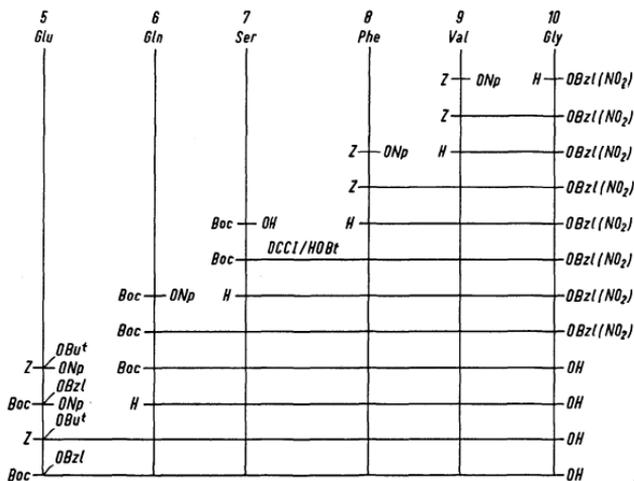
Postanschrift: Prof. Dr. Fr. Schneider, Physiologisch-Chemisches Institut der Universität, D-355 Marburg, Lahnberge.

Abkürzungen: HOBt = 1-Hydroxybenzotriazol; OBu^t = *t*-Butylester; DMBH = 4,4'-Dimethoxybenzhydril; OBzl = Benzylester; die übrigen verwendeten Abkürzungen sind in der vorstehenden Mitteilung^[1] erläutert.

Enzym: Streptokokken-Proteinase (EC 3.4.22.10).



Synthese-Schema I.



Synthese-Schema II.

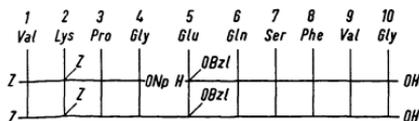
peln, aus dem das Hydrazid erhalten werden konnte.

Ging man vom Tetrapeptid-*p*-nitrobenzylester aus, erhielt man mit Boc-Gln-ONp ein noch Dimethylformamid-lösliches Pentapeptidderivat. Die Hydrogenolyse des *p*-Nitrobenzylesters ließ sich auf dieser Stufe in Dimethylformamid durchführen. Anschließende „Salzkupplungen“ mit Z-Glu(OBu^t)-ONp^[8] bzw. Boc-Glu(OBzl)-ONp^[9] führten zu den teilgeschützten *N*-Acylhexapeptiden, die in Dimethylformamid ebenfalls löslich waren.

Ein weiteres Problem dieser Sequenz war die Bildung des Pyroglutaminsäure-Derivates 6–10 nach Abspaltung des Boc-Restes mit Trifluoressigsäure: Nach 12 h zeigten sich Spuren eines Ninhydrin-negativen, Chlor-Tolidin-positiven Nebenproduktes, nach 3 Wochen betrug dieses Nebenprodukt ca. 40%. Es wurde daher nur frisch bereiteter Peptidester sofort weiterverarbeitet.

Synthese des Fragments III: Val-Lys-Pro-Gly-Glu-Gln-Ser-Phe-Val-Gly

Durch Reaktion des geschützten Tetrapeptid-p-nitrophenylesters 1–4^[1] mit Glu(OBzl)-Gln-Ser-Phe-Val-Gly wurde das in Dimethylformamid



Synthese-Schema III. Sequenz 1–10.

schwerlösliche *N*-Acyldecapeptid 1–10 erhalten (s. Schema III), das für weitere Umsetzungen nach allen gängigen Kupplungsmethoden (mit Ausnahme der Azidmethode) zur Verfügung steht.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Unterstützung der Arbeit im Rahmen des Schwerpunktsprogramms „Synthese makromolekularer Naturstoffe“.

Beschreibung der Versuche

Allgemeine Hinweise s. I. c.^[1].

Fragment II

Z-Val-Gly-OMe

12.5 g Z-Val^[10] (0.05 mol) und 6.25 g Gly-OMe × HCl (0.05 mol) wurden in 100 ml Chloroform eingerührt, bei

0°C mit 7 ml Triäthylamin (0.05 mol) und 10.1 g Dicyclohexylcarbodiimid (0.05 mol) in 50 ml Chloroform versetzt. Man ließ über Nacht auf Zimmertemperatur kommen, filtrierte vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff ab, engte ein und nahm den Rückstand in Essigester auf. Diese Lösung wurde wie üblich mit 5proz. NaHCO₃, KHSO₄-Lösung und Wasser ausgeschüttelt. Nach Trocknen und Einengen wurde aus Essigester/Petroläther kristallisiert und aus Äthanol/Petroläther umkristallisiert.

Ausbeute: 13 g (81%); Schmp. 156–157°C. [α]_D²⁴: –25.4° (c=1, in Methanol). DC: V, VI, VII einheitlich.

C₁₆H₂₂N₂O₅ (322.4) Ber. C 59.61 H 6.88 N 8.68
Gef. C 59.49 H 6.82 N 8.78

Durch Umsatz von Z-Val-ONp^[3] mit Gly-OMe × HCl in Dimethylformamid und Triäthylamin als Base erhielt man in 80proz. Ausbeute ein Produkt vom Schmp. 158–159°C. Die Isolierung des Produktes erfolgte hierbei durch Eingießen des Ansatzes in Eiswasser, wobei das Peptid ausfiel.

Val-Gly-OMe × CH₃CO₂H

32.2 g Z-Val-Gly-OMe (0.1 mol) wurden in 500 ml Methanol unter Zusatz von 10 ml Eisessig katalytisch hydriert. Nach Abfiltrieren des Katalysators wurde eingeeengt zu einem Öl, das 2 h lang über KOH/P₂O₅ getrocknet wurde.

DC: I, II, III einheitlich.

Z-Phe-Val-Gly-OMe

Val-Gly-OMe × CH₃CO₂H (0.1 mol) wurde in 150 ml Dimethylformamid gelöst und bei 0°C mit 42 g Z-Phe-ONp^[4] (0.1 mol) sowie 14 ml Triäthylamin (0.1 mol) versetzt. Man rührte 24 h bei 0°C und 24 h bei Zimmertemperatur. Der Ansatz begann nach ca. 2 h teilweise fest zu werden; es wurde in Eiswasser eingegossen. Man filtrierte ab, wusch gut mit Wasser und kristallisierte 2mal aus Äthanol/Petroläther.

Ausbeute: 42 g (90%); Schmp. 193–195°C. [α]_D²⁴: –33.0° (c=1, in Methanol). DC: V, VI, VII einheitlich.

C₂₅H₃₁N₃O₆ (469.6) Ber. C 63.94 H 6.65 N 8.94
Gef. C 63.92 H 6.74 N 8.88

Phe-Val-Gly-OMe × HBr

23.5 g Z-Phe-Val-Gly-OMe (0.05 mol) wurden mit 150 ml 2N HBr in Eisessig übergossen. Unter gelegentlichem Umschütteln wurde 1 h unter Feuchtigkeitsabschluß stehengelassen. Man engte ein, vertrieb den Rückstand mit absol. Äther, saugte ab und kristallisierte aus Äthanol/Petroläther/Äther.

Ausbeute: 20.3 g (89%); Schmp. 197–199°C. [α]_D²⁴: –16.9°. DC: I, II, III, IV einheitlich.

C₁₇H₂₆BrN₃O₄ (416.3) Ber. N 10.09
Gef. N 10.18

Z-Ser-Phe-Val-Gly-OMe

12 g Z-Ser^[11] (0.05 mol), 12 g Phe-Val-Gly-OMe × HBr (0.05 mol) und 10 g Hydroxybenzotriazol (0.075 mol) wurden in 300 ml Dimethylformamid gerührt. Bei -10°C gab man 6 ml *N*-Methylmorpholin (0.05 mol) und dann 11 g Dicyclohexylcarbodiimid (0.051 mol) in 50 ml Dimethylformamid zu. Man rührte im Eisbad weiter, ließ über Nacht auf Zimmertemperatur kommen, trennte vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff ab und goß in 1.5 l eiskalte NaCl-Lösung ein. Dabei fiel das Produkt aus. Es wurde abgesaugt und mit Wasser gewaschen. Man nahm in heißem Essigester auf, schüttelte wie üblich aus, trocknete und engte ein. Die Kristallisation erfolgte aus Äthanol.

Ausbeute: 21 g (74%); Schmp. 213–216°C. $[\alpha]_D^{24}$: -14.1° ($c=1$, in Dimethylformamid). DC: I, II, V einheitlich.

C₂₈H₃₆N₄O₈ (556.6) Ber. C 60.42 H 6.52 N 10.45
Gef. C 60.38 H 6.58 N 10.00

Ser-Phe-Val-Gly-OMe × CH₃CO₂H

5.6 g (0.01 mol) *Z*-Ser-Phe-Val-Gly-OMe wurden wie üblich in 200 ml Methanol unter Zusatz von Eisessig mit Pd/Aktivkohle hydriert. Nach der Aufarbeitung hinterblieb ein Sirup, der nach Äthanol-Zugabe fest wurde. Es wurde umgefällt aus Äthanol mit etwas Äther.

Ausbeute: 4.3 g (89.5%); Schmp. 155–157°C. $[\alpha]_D^{24}$: -7.2° ($c=1$, in Dimethylformamid). DC: I, II, III einheitlich.

C₂₂H₃₄N₄O₈ (482.5) Ber. N 11.61
Gef. N 11.44

Boc-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-OMe

7.6 g Boc-Gln-ONp^[6] (0.02 mol) und 9.6 g Ser-Phe-Val-Gly-OMe × HAc (0.02 mol) wurden in 150 ml Dimethylformamid gelöst. Bei 0°C gab man 2.8 ml Triäthylamin hinzu, rührte 12 h im Eisbad und 20 h bei Zimmertemperatur. Nach 3 h begann der Kolbeninhalt zu gelieren. Es wurde noch Dimethylformamid zugegeben und weiter gerührt. Schließlich gab man etwas Äther hinzu, saugte ab, wusch gut mit 1N NH₄OH-Lösung und Wasser und kochte anschließend mehrmals mit Methanol aus.

Ausbeute: 11 g (84%); Schmp. 222–224°C. $[\alpha]_D^{24}$: -13.8° ($c=0.5$, in Dimethylformamid). DC: I, II, III einheitlich.

C₃₀H₄₆N₆O₁₀ (650.8) Ber. C 55.37 H 7.12 N 12.91
Gef. C 55.21 H 7.05 N 12.66

Gln-Ser-Phe-Val-Gly-OMe × CF₃CO₂H

6.5 g Boc-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-OMe (0.01 mol) wurden wie üblich mit Trifluoressigsäure deacyliert. Nach Einengen wurde der ölige Rückstand mit Äther verrieben, abgesaugt, mit Äther gewaschen und 2 h über P₂O₅/KOH getrocknet.

Ausbeute: 6.5 g (100%); Schmp. 172–174°C. DC: I, II einheitlich, III eine sehr kleine Nebenbande, wahrscheinlich Pyroglutaminsäurepeptid.

Das Produkt wurde sofort weiterverarbeitet.

Z-Glu(OBu^t)-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-OMe

4.6 g (0.01 mol) *Z*-Glu(OBu^t)-ONp^[8] wurden zusammen mit 6.6 g (0.01 mol) Gln-Ser-Phe-Val-Gly-OMe in 150 ml Dimethylformamid unter Zusatz von 1.4 ml Triäthylamin (0.01 mol) gelöst. Unter Rühren ließ man langsam von 0°C auf Zimmertemperatur kommen; nach 3 h begann das Produkt gallertig auszufallen. Zur Aufarbeitung wurde in Äther eingerührt, abgesaugt mit 1N NH₄OH und Wasser gewaschen und mit Methanol ausgekocht. Das Peptid ist in Dimethylformamid sehr schwer löslich.

Ausbeute: 7 g (80%); Schmp. 198–200°C. $[\alpha]_D^{24}$: -16.6° ($c=0.5$, in Dimethylformamid). DC: I, II, III einheitlich.

C₄₂H₅₉N₇O₁₃ (870.0) Ber. C 57.98 H 6.83 N 11.27
Gef. C 57.49 H 6.99 N 11.06

Aminosäureanalyse:

| | Glu | Ser | Phe | Val | Gly |
|------|------|------|------|------|------|
| Ber. | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Gef. | 2.07 | 0.88 | 1.00 | 1.00 | 1.00 |

Z-Glu(OBu^t)-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-N₂H₃

8.7 g *Z*-Glu(OBu^t)-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-OMe (0.01 mol) wurden in 250 ml Dimethylformamid heiß gelöst. Nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur (die Lösung wurde dabei trübe) wurden 5 ml Hydrazinhydrat (0.1 mol) hinzugefügt und heftig gerührt. Nach 5–6 h wurde der Kolbeninhalt geleartig. Nach 2 Tagen wurde in Eiswasser eingerührt, abgesaugt und mit Methanol ausgekocht. Das Peptidhydrazid quoll in Methanol stark, es wurde abzentrifugiert und über CaCl₂ bei 40°C getrocknet.

Ausbeute: 7.9 g (91%); Schmp. 240°C. $[\alpha]_D^{24}$: -7.6° ($c=0.5$, in Dimethylformamid). DC: I, II, III noch Spuren Ester nachzuweisen.

C₄₁H₅₉N₉O₁₂ (870.0) Ber. C 56.60 H 6.83 N 14.48
Gef. C 56.50 H 6.84 N 14.34

Z-Val-Gly-OBzl(NO₂)

36 g *Z*-Val-ONp^[3] (0.1 mol) und 29 g Gly-OBzl(NO₂) × HBr^[2] (0.1 mol) wurden in 400 ml Dimethylformamid aufgenommen und mit 14 ml Triäthylamin (0.1 mol) versetzt. Nach 24 h bei 0°C und 12 h bei Zimmertemperatur wurde in Eiswasser eingegossen. Dabei fiel das Produkt aus. Es wurde umkristallisiert aus Äthanol/Petroläther.

Ausbeute: 38 g (86%); Schmp. 159–161°C. $[\alpha]_D^{24}$: -17.7° ($c=1$, in Methanol). DC: V, VI, VII einheitlich.

C₂₂H₂₅N₃O₇ (443.5) Ber. C 59.59 H 5.64 N 9.48
Gef. C 59.54 H 5.73 N 9.32

Val-Gly-OBzl(NO₂) × HBr

44.3 g Z-Val-Gly-OBzl(NO₂) (0.1 mol) wurden mit 200 ml 2N HBr in Eisessig übergossen und unter gelegentlichem Umschütteln 1 h unter Feuchtigkeitsausschluß stehengelassen. Nach Einengen wurde das resultierende Öl über KOH/P₂O₅ getrocknet. Nach mehreren Wochen trat langsame Kristallisation ein. Umkristallisation erfolgte aus Äthanol/Äther/Petroläther.

Ausbeute: 34 g (87%); Schmp. 180–182°C. $[\alpha]_D^{24}$: +10.9 (c=1, in Methanol). DC: I, II, III einheitlich.

C₁₄H₂₀BrN₃O₅ (390.2) Ber. N 10.77
Gef. N 10.61

Z-Phe-Val-Gly-OBzl(NO₂)

42 g Z-Phe-ONp^[4] (0.1 mol) und 39 g Val-Gly-OBzl(NO₂) × HBr (0.1 mol) wurden in 500 ml Dimethylformamid von 0°C gelöst und mit 14 ml Triäthylamin (0.1 mol) versetzt, wobei Triäthylamin-hydrobromid ausfiel. Nach 24 h bei 0°C und 12 h bei Zimmertemperatur wurde in 1.5 l Eiswasser gegossen, wobei das Produkt ausfiel. Es wurde abgesaugt, gewaschen mit Wasser, in Ammoniaklösung, Wasser und aus Methanol umkristallisiert, wobei auf sehr langsame Abkühlung geachtet werden mußte, da sonst eine nicht filterbare Gallerte entstand.

Ausbeute: 54 g (90%); Schmp. 157–160°C. $[\alpha]_D^{24}$: –7.5° (c=1, in Dimethylformamid). DC: I, II, V einheitlich.

C₃₁H₃₄N₄O₈ (590.6) Ber. C 63.05 H 5.82 N 9.49
Gef. C 63.08 H 5.81 N 9.33

Phe-Val-Gly-OBzl(NO₂) × HBr

29.5 g Z-Phe-Val-Gly-OBzl(NO₂) (0.05 mol) wurden mit 150 ml 2N HBr in Eisessig übergossen und unter Feuchtigkeitsausschluß und gelegentlichem Umschütteln 1 h lang bei Zimmertemperatur stehen gelassen; dann wurde das Lösungsmittel abgezogen und der ölige Rückstand zweimal aus Äthanol/Äther umkristallisiert.

Ausbeute: 46 g (85%); Schmp. 212–215°C. $[\alpha]_D^{24}$: –16.9° (c=1, in Methanol). DC: I, II, III einheitlich.

C₂₃H₂₉BrN₄O₆ (537.4) Ber. N 10.42
Gef. N 10.38

Boc-Ser-Phe-Val-Gly-OBzl(NO₂)

21.6 g Phe-Val-Gly-OBzl(NO₂) × HBr (0.04 mol) und 8.2 g Boc-Ser^[12] wurden in 250 ml Dimethylformamid aufgeschlämmt und bei –5°C mit 6.7 g Hydroxybenzotriazol (0.05 mol) und 4.8 ml N-Methylmorpholin (0.04 mol) versetzt. Dazu gab man 8.8 g Dicyclohexylcarbodiimid (0.044 mol) in 60 ml Dimethylformamid von 0°C. Es wurde 8 h gerührt, wobei man auf Zimmertemperatur kommen ließ. Nach Abfiltrieren des ausgefallenen Dicyclohexylharnstoffs wurde in kalte ges. NaCl-Lösung eingerührt, wobei das Produkt ausfiel. Es wurde abgesaugt und aus Äthanol/Wasser, Aceton und Essigester umkristallisiert.

Ausbeute: 17 g (65%); Schmp. 175–177°C. $[\alpha]_D^{24}$: –35.0° (c=1, in Methanol). DC: I, II, V einheitlich.

C₃₁H₄₁N₅O₁₀ (643.7) Ber. C 57.84 N 6.42 N 10.87
Gef. C 57.81 H 6.33 N 10.62

Ser-Phe-Val-Gly-OBzl(NO₂) × CF₃CO₂H

12.8 g Boc-Ser-Phe-Val-Gly-OBzl(NO₂) wurden in 100 ml Trifluoressigsäure gelöst. Nach 30 min wurde eingeeengt und das Produkt mit absol. Äther gefällt. Es wurde abgesaugt und ohne Umkristallisation weiterverarbeitet (eine Umkristallisation aus Äthanol/Äther lieferte eine schlecht absaugbare Gallerte).

Ausbeute: 12 g (90%); Schmp. 187–190°C. $[\alpha]_D^{24}$: +3.0° (c=1, in Dimethylformamid). DC: I, II, V einheitlich.

C₂₈H₃₄F₃N₅O₁₀ (657.6) Ber. N 10.65
Gef. N 10.91

Boc-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-OBzl(NO₂)

7.3 g Boc-Gln-ONp^[6] (0.02 mol) und 13.4 g Ser-Phe-Val-Gly-OBzl(NO₂) × CF₃CO₂H (0.02 mol) wurden in 250 ml Dimethylformamid gelöst und mit 2.8 ml Triäthylamin (0.02 mol) versetzt. Man ließ 24 h bei 0°C stehen und anschließend 24 h bei Zimmertemperatur. Dabei fiel ein Teil des Produktes aus. Die Fällung wurde durch Zugabe von Eiswasser vervollständigt. Nach Absaugen und Waschen mit Wasser, in NH₄OH, Wasser, wurde das Produkt mit Äthanol ausgekocht. Zur Analyse wurde eine Probe aus viel Äther umkristallisiert.

Ausbeute: 13 g (84%); Schmp. 212–215°C. $[\alpha]_D^{24}$: –12.8° (c=1, in Dimethylformamid). DC: I, II, III eine kleine Nebenbande.

C₃₈H₄₉N₇O₁₂ (771.8) Ber. C 56.03 H 6.39 N 12.70
Gef. C 56.03 H 6.47 N 12.71

Boc-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-OH

7.7 g Boc-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-OBzl(NO₂) wurden in 150 ml Dimethylformamid suspendiert und bei Zimmertemperatur mit PdO₂ hydriert. Man engte ein, versetzte mit Methanol, filtrierte nach einigen Stunden bei 0°C ab und kristallisierte um aus 150 ml Methanol, dem einige ml Dimethylformamid zugesetzt waren.

Ausbeuten: 5.5 g (86%); Schmp. 195–196°C. $[\alpha]_D^{24}$: –11.1° (c=1, in Dimethylformamid). DC: I, II, III bei starkem Auftragen eine kleine Nebenbande.

C₂₉H₄₄N₆O₁₀ (636.7) Ber. C 54.70 H 6.96 H 13.21
Gef. C 54.74 H 6.80 H 13.28

Gln-Ser-Phe-Val-Gly-OH × CF₃CO₂H

6.4 g Boc-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-OH wurden mit 40 ml Trifluoressigsäure übergossen und nach 30 min wurde Trifluoressigsäure im Vak. entfernt und das Peptid-Trifluoroacetat mit absol. Äther gefällt.

Ausbeute: 6 g (95%); Schmp. unscharf 89–112°C.

Das Peptid wurde sofort weiterverarbeitet, da nach einigen Tagen eine zusätzliche Ninhydrin-negative

Bande im Chromatogramm auftauchte. Nach ca. 4 Wochen betrug der Anteil dieser Komponente schon ca. 40–50%. Es dürfte sich dabei um das Pyroglutaminsäure-Derivat handeln.

Boc-Glu(OBzl)-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-OH

19.5 g Gln-Ser-Phe-Val-Gly-OH \times CF₃CO₂H (0.03 mol) und 14 g Boc-Glu(OBzl)ONp^[9] (0.033 mol) wurden in 400 ml Dimethylformamid von 0°C gelöst. Dann tropfte man unter Rühren 8.4 ml (0.06 mol) Triäthylamin langsam zu. Dabei bildete sich eine gallertige Fällung. 5 bis 6 h nach der Triäthylamin-Zugabe hatte sich alles wieder gelöst. Man ließ noch 2 Tage bei Zimmertemperatur rühren, goß dann in Eiswasser ein, säuerte mit KHSO₄-Lösung auf pH 4 an und saugte das ausgefallene Produkt ab. Nach Trocknen wurde umkristallisiert aus Dimethylformamid/Methanol.

Ausbeute: 18 g (72%); Schmp. 233–235°C. $[\alpha]_D^{24}$: -9.8° (c = 0.5, in Dimethylformamid). DC: I, II, III, IV einheitlich.

C₄₁H₅₇N₇O₁₃ (856.0) Ber. C 57.53 H 6.71 N 11.37
Gef. C 57.53 H 6.84 N 11.19

Aminosäureanalyse:

| | Glu | Ser | Phe | Val | Gly |
|------|------|------|------|------|------|
| Ber. | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Gef. | 2.00 | 0.94 | 0.98 | 0.99 | 0.99 |

Glu(OBzl)-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-OH \times CF₃CO₂H

17 g Boc-Glu(OBzl)-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-OH (0.02 mol) wurden mit 100 ml Trifluoressigsäure übergossen, wobei sich nach ca. 10 min alles gelöst hatte. Nach 1/2 h wurde die Trifluoressigsäure im Vak. abgezogen und das freie Peptid-Trifluoressigsäure mit absol. Äther gefällt.

Ausbeute: 17 g (quantitativ); Schmp. 193–195°C. $[\alpha]_D^{24}$: +0.8° (c = 0.5, in Dimethylformamid). DC: I, II, III einheitlich.

C₃₈H₅₀F₃N₇O₁₃ (869.9) Ber. N 11.27
Gef. N 11.49

Z-Glu(OBu^t)-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-OH

22.7 g (0.035 mol) Gln-Ser-Phe-Val-Gly \times CF₃CO₂H wurden mit 16 g Z-Glu(OBu^t)-ONp^[8] in 300 ml Dimethylformamid gelöst. Bei 0°C wurden dann langsam 9.8 ml Triäthylamin (0.07 mol) zugegeben. Dabei gelierte der Kolbeninhalt. Nach Zugabe von weiteren 100 ml Dimethylformamid wurde heftig im Eisbad gerührt. Nach ca. 2 h entstand eine klare Lösung. Man rührte noch 24 h bei Zimmertemperatur weiter, goß in 1.5 l Eiswasser ein, stellte auf pH 4.5, wobei das Produkt ausfiel. Nach Absaugen und Trocknen wurde mit Äthanol ausgekocht und dann aus Dimethylformamid/Methanol umgefällt. Während das Rohprodukt noch mit Z-Glu(OBu^t)-ONp verunreinigt war, war die umgefällte Peptidsäure chromatographisch einheitlich; sie ließ sich nur schlecht absaugen.

Ausbeute: 6.5 g (75%); Schmp. 233°C. $[\alpha]_D^{24}$: -11.0°

(c = 0.5, in Dimethylformamid). DC: I, II, III, IV einheitlich.

C₄₁H₅₇N₇O₁₃ (856.0) Ber. C 57.53 H 6.71 N 11.45
Gef. C 56.92 H 6.96 N 11.73

Aminosäureanalyse:

| | Glu | Ser | Phe | Val | Gly |
|------|------|------|------|------|------|
| Ber. | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Gef. | 1.97 | 1.01 | 1.02 | 1.08 | 1.00 |

Boc-Ser-Phe-Val-Gly-OH

12.8 g (0.02 mol) Boc-Ser-Phe-Val-Gly-OBzl(NO₂) wurden in 200 ml Methanol mit Pd/Aktivkohle hydriert. Nach Abtrennen des Katalysators und Einengen wurde in Äthanol aufgenommen und mit Petroläther versetzt. Es bildete sich eine gut absaugbare Fällung. Zur Reinigung wurde der getrocknete Niederschlag (9.2 g) in 150 ml 5proz. wäßrigen NaHCO₃ gelöst und die alkal. Lösung 3mal mit Äthylacetat extrahiert. Dadurch ließen sich die gefärbten Verunreinigungen abtrennen. Nach Abkühlen wurde die wäßrig-alkal. Lösung vorsichtig mit KHSO₄ (5proz.) angesäuert (pH 4), wobei das Produkt ausfiel. Es wurde mit Eiswasser gewaschen und getrocknet.

Ausbeute: 7.5 g (75%); Schmp. 228–231°C, Zers. ab 180°C. $[\alpha]_D^{24}$: -12.6° (c = 1, in Dimethylformamid). DC: I, II, V einheitlich.

C₂₄H₃₆N₄O₈ (509.0) Ber. N 11.01
Gef. N 11.59

Eine zweite Fraktion erhielt man durch Sättigen der wäßrigen Mutterlauge mit NaCl und Ausschütteln mit Essigester. Das Produkt sammelte sich dabei in fester Form in der Essigester-Phase.

Ser-Phe-Val-Gly-OH \times CF₃CO₂H

9.8 g (0.02 mol) Boc-Ser-Phe-Val-Gly wurden in 50 ml Trifluoressigsäure gelöst, nach 30 min wurde eingengt und mit Äther gefällt. Das Produkt wurde abgesaugt und mit Aceton gewaschen.

Ausbeute: 9.2 g (91%); Schmp. 178–180°C. $[\alpha]_D^{24}$: -58.6° (c = 1, in Wasser). DC: I, II, III einheitlich.

Z-Gln(DMBH)-Ser-Phe-Val-Gly-OH

6.3 g Z-Gln(DMBH)-ONp^[7] (0.01 mol) und 5.2 g Ser-Phe-Val-Gly-OH \times CF₃CO₂H (0.01 mol) wurden in 120 ml kaltem Dimethylformamid gelöst. Nach Zugabe von 2.8 ml Triäthylamin (0.01 mol) wurde erst im Eisbad (6 h), dann 24 h bei Zimmertemperatur heftig gerührt. Schließlich goß man in Eiswasser, stellte auf pH 4 ein, saugte ab, trocknete, löste in heißem Dimethylformamid und versetzte vorsichtig mit Methanol. Das Produkt löste sich nur noch in kochendem Dimethylformamid.

Ausbeute: 9.9 g (95%); Schmp. 250°C. $[\alpha]_D^{24}$: -3.2° (c = 0.5, in Dimethylformamid). DC: I, II, III eine Nebenbande.

$C_{47}H_{56}N_6O_{12}$ (897.0) Ber. N 9.37
Gef. N 9.49

Sequenz 1–10: Z-Val-Lys(Z)-Pro-Gly-Glu(OBzl)-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-OH

17.6 g Glu(OBzl)-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-OH \times CF₃CO₂H (0.02 mol) und 15.4 g Z-Val-Lys(Z)-Pro-Gly-ONp (0.02 mol) wurden bei 0°C in 300 ml Dimethylformamid gelöst, dann ließ man unter Rühren 5.6 ml Triäthylamin zutropfen. Dabei bildete sich eine gallertige Fällung. Man gab noch 100 ml Dimethylformamid zu, ließ unter starkem Rühren über Nacht auf Zimmertemperatur kommen und rührte noch 24 h bei Zimmertemperatur. Nach ca. 6 h bildete sich eine klare Lösung, anschließend goß man in 1.5 l Eiswasser. Nach Ansäuern auf pH 4 mit 3N HCl fiel das Produkt aus. Es wurde abgesaugt, gut abgepreßt und der feuchte Filterkuchen in ca. 800 ml kochendem Äthanol aufgenommen. Beim Abkühlen fiel das Produkt in gut absaugbarer Form aus. Es wurde abgenutscht und mit Äthanol und Äther ausgewaschen und im Vak. getrocknet. Das Peptid ist löslich in warmem Dimethylformamid.

Ausbeute: 23 g (70.3%); Schmp. 217–218°C. $[\alpha]_D^{24}$: –13.2° ($c=0.5$, in Dimethylformamid). DC: I, II, III, IV einheitlich.

$C_{70}H_{92}N_{12}O_{19}$ (1405.6) Ber. C 59.81 H 6.59 N 11.95
Gef. C 59.58 H 6.69 N 11.58

Aminosäureanalyse:

| | Val | Lys | Pro | Gly | Glu | Ser | Phe |
|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Ber. | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 |
| Gef. | 1.95 | 0.99 | 0.99 | 2.04 | 2.00 | 0.86 | 0.97 |

Literatur

- 1 I. Mittel.: Schaich, E. & Schneider, Fr. (1974) *diese Z.* **355**, 939–944, vorstehend.
- 2 Wünsch, E. & Zwick, A. (1964) *Chem. Ber.* **97**, 2497–2503.
- 3 Eisele, K. (1968) Diplomarbeit, Biochemisches Inst. Univ. Tübingen.
- 4 Bodansky, M. & Du Vigueand, V. (1959) *J. Amer. Chem. Soc.* **81**, 6072–6075.
- 5 Wünsch, E. & Jentsch, J. (1964) *Chem. Ber.* **97**, 2490–2496.
- 6 Zahn, H., Danho, W. & Gutte, B. (1966) *Z. Naturforsch.* **21b**, 763–773.
- 7 König, W. & Geiger, R. (1970) *Chem. Ber.* **103**, 2041–2051.
- 8 Schnabel, E. (1964) *Z. Naturforsch.* **19b**, 120–124.
- 9 Li, C. H., Gorup, B., Chung, D. & Ramachandra, J. (1963) *J. Org. Chem.* **28**, 178–181.
- 10 Grassmann, W. & Wünsch, E. (1958) *Chem. Ber.* **91**, 462–465.
- 11 Guttman, S. & Boissonnas, R. A. (1958) *Helv. Chim. Acta* **41**, 1852–1867.
- 12 Schnabel, E. (1967) *Liebigs Ann. Chem.* **702**, 188–196.